

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

MÉTODOS ANALÍTICOS EXISTENTES PARA DETERMINAR EL ESTADO NUTRICIONAL EN YODO EN LA POBLACIÓN

Autor: Alicia del Campo Mayor

Tutor: Elena Rodríguez Rodríguez

Convocatoria: Junio 2017

Contenido

1. Resumen	3
2. Introducción y antecedentes	3
2.1. Importancia del yodo en el organismo	3
2.2. Fuentes dietéticas de yodo	4
2.3. Metabolismo del yodo	4
2.4. Patologías tiroideas asociadas a alteraciones en el aporte de yodo	5
2.4.1. Trastornos asociados al exceso de yodo.	5
2.4.2. Trastornos asociados a la carencia de yodo.	6
2.5. Ingestas recomendadas	7
3. Objetivos	7
4. Metodología	8
5. Resultados y discusión	8
5.1. Métodos para evaluar el estado nutricional en yodo en la población.	8
5.2. Determinación de la yoduria en la población	9
5.2.1. Recogida y tratamiento de las muestras de orina	10
5.2.2. Métodos analíticos existentes para la determinación de la yoduria	11
a) Métodos colorimétricos	11
I Método de las cenizas secas	12
II Método de las cenizas húmedas	12
b) Electroodos selectivos de iones	14
c) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica	15
d) Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP- Masas)	16
5.2.3. Comparación de los métodos analíticos estudiados	18
6. Conclusión	19
7. Bibliografía	19

1. Resumen

La deficiencia de yodo es un problema muy acusado en todo el mundo, por lo que su determinación en la población es importante para evitar enfermedades muy graves que afectan sobre todo al crecimiento de niños.

La orina, por su facilidad de recogida y porque el yodo se elimina mayoritariamente por esta vía, es la muestra de elección para hacer estas determinaciones. Entre los métodos más empleados destacan la reacción de Sandell- Kolthoff, los electrodos selectivos de iones, la cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica, y la ICP- MS, que resulta ser el método de elección por su alta precisión, sus bajos límites de detección y por su capacidad de analizar grandes cantidades de muestra

2. Introducción y antecedentes

2.1. Importancia del yodo en el organismo

El yodo es un micronutriente esencial para la formación de hormonas tiroideas que debe ser ingerido con los alimentos, ya que el organismo es incapaz de sintetizarlo.

El organismo almacena el yodo en la glándula tiroides, que está situada en el centro de la parte anterior e inferior del cuello. De los 20 a 30 mg de yodo disponibles en el organismo, más del 75% se acumulan en esta glándula. En la tiroides existen dos tipos de células ¹:

- Células foliculares: encargadas de la síntesis y liberación de hormonas tiroideas y sus precursores. Las hormonas tiroideas son: tiroxina o T₄ y la triyodotironina o T₃.
- Células C: productoras de calcitonina, importante en la regulación del calcio en la sangre ².

Algunas de las funciones ³ más importantes de las hormonas tiroideas son:

- Favorece el desarrollo de SN en el feto e incrementa a capacidad de respuesta a estímulos y la velocidad de sus reflejos.
- Aumento de la ventilación pulmonar y dota de mayor profundidad a las inspiraciones.
- Incrementa la capacidad de transporte de oxígeno, aumenta el gasto cardiaco y la frecuencia cardiaca, incrementa la fuerza de contracción cardiaca, produce vasodilatación, disminución de la resistencia total periférica y elimina calor.
- Movilización de lípidos y lipólisis, aumento de ácidos grasos libres, síntesis de proteínas, niveles de colesterol el plasma, participa en la neoglucogénesis y glucogenolisis

- Interviene en el normal desarrollo y funcionamiento del aparato reproductor.
- Acción termogénica.

Es necesario que exista una adecuada producción de hormonas T_3 y T_4 , lo que se lleva a cabo por la acción conjunta de tiroides, hipófisis e hipotálamo, a través de mediadores como son la hormona estimulante de la tiroides (TSH) que estimula la tiroides cuando los niveles de hormonas son bajos, y la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que estimula a la hipófisis para que sintetice TSH.

2.2. Fuentes dietéticas de yodo

El yodo es un nutriente esencial que debe ser ingerido con los alimentos, ya que el organismo es incapaz de sintetizarlo, siendo las principales fuentes naturales de yodo el agua del mar y el suelo ⁴.

Los alimentos de origen marino como pescados y mariscos (almejas, sardinas...) tienen mayores concentraciones de yodo porque los estos animales concentran el yodo del agua del mar, aportando unos 300 a 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por otro lado, los peces de agua dulce tan sólo aportan unos 20- 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ⁵.

El contenido en yodo en la carne y alimentos provenientes de animales como la leche y el queso, depende del suelo y de las plantas que sirven de alimento para estos animales. El contenido en yodo de alimentos vegetales va a depender de la composición del suelo y de las condiciones de cultivo.

Los alimentos procesados o industriales también pueden contener yodo, debido a que en su elaboración se emplean yodóferos como aditivos, que suponen aportes extra de yodo. Debe considerarse especialmente, la eritrosina, aditivo utilizado en pastelería, confitería y embutidos que contiene unos 600 $\mu\text{g}/\text{g}$ de yodo ⁴.

El yodo se puede añadir a la sal en forma de yoduro de potasio o yodato, convirtiéndose en sal yodada, factor importante en la reducción significativa de la incidencia de deficiencia de yodo ⁶.

2.3. Metabolismo del yodo

Su contenido en el cuerpo adulto es de aproximadamente 15- 20 mg, de los cuales el 70- 80% está en la glándula tiroides ⁵. La tiroides concentra selectivamente el yoduro en cantidades adecuadas para la síntesis de hormonas tiroides, y la mayor parte del yodo restante se excreta por la orina, aunque también hay pequeñas cantidades que se eliminan por las heces y el sudor.

La eliminación del yodo circulante varía con la ingesta de yodo. En situaciones en las que la cantidad de yodo nutricional es adecuado, tan sólo el 10% o menos del yodo absorbido, es captado por la tiroides

⁵. Existen varios tejidos capaces de almacenar yoduro: glándulas salivales, plexo coroideo...

En situaciones normales, el yodo plasmático tiene una vida media de aproximadamente 10 horas, tiempo que se reduce en personas con deficiencia de yodo. El riñón no tiene ningún mecanismo para conservar el yoduro, por lo que representa la ruta principal de excreción de yodo, aproximadamente del 80- 90% ⁵. La excreción urinaria habitual excede de 100 µg/L si la ingesta es adecuada. La excreción fecal de yoduro es relativamente baja, oscila entre los 6,7 y 42,1 µg/día ⁵.

2.4. Patologías tiroideas asociadas a alteraciones en el aporte de yodo

El aporte inadecuado de yodo produce trastornos graves como discapacidad cognitiva, complicaciones durante el embarazo como la muerte fetal y anomalías congénitas, además de la posibilidad de causar lesiones cerebrales irreversibles en el feto.

Su deficiencia representa un problema nutricional importante y no está sujeta al desarrollo socioeconómico de una zona como el resto de las deficiencias nutricionales, sino que les afectan factores ambientales e intrínsecos ligados al ciclo biológico del mineral ⁵. El 30% de la población vive en zonas con deficiencia de yodo en el suelo, y más de 2.000 millones de individuos viven con un insuficiente consumo de yodo. En Europa, las cifras de personas ligeramente deficientes de este elemento son del 50% de la población ^{6,8}, a pesar de existir un programa de yodoprofilaxis ⁹

2.4.1. Trastornos asociados al exceso de yodo.

La toxicidad por yodo es prácticamente nula, sin embargo, se pueden producir alteraciones como consecuencia de un aporte excesivo de yodo. Estas patologías son: hipertiroidismo y tirocoxicosis.

El *hipertiroidismo* es una patología en la que hay una producción excesiva y mantenida de hormonas tiroideas. Se trata de una enfermedad poco frecuente y más prevalente en mujeres, personas fumadoras y ancianos. Entre las causas destacan: la enfermedad de Graves, bocio tóxico nodular o multinodular, tiroiditis, o una ingesta excesiva tanto de yodo ⁷.

Los pacientes con hipertiroidismo leve pueden no tener ningún síntoma. Los síntomas se hacen más importantes a medida que la enfermedad empeora, y generalmente se relacionan con un aumento del metabolismo corporal. Entre estos síntomas destacan: pérdida de peso, nerviosismo, ansiedad, temblores, cambios en los patrones menstruales, dificultades para dormir, debilidad muscular, etc⁷

La *tirocoxicosis* es un empeoramiento de los síntomas del hipertiroidismo como consecuencia del estrés o una infección. Algunos de los síntomas que padece la persona en esta situación son: elevación de la presión arterial sistólica, disminución de la presión arterial diastólica, náuseas, vómitos, diarrea, fiebre elevada⁷...

2.4.2. Trastornos asociados a la carencia de yodo.

La deficiencia de yodo se relaciona con importantes alteraciones en la salud que se conocen con el nombre de trastornos por déficit de yodo (TDY). Algunos de ellos son: retraso mental, anomalías congénitas, bajo peso al nacer en los recién nacidos....

Bocio

El bocio es una hiperplasia o mayor grado de desarrollo de la glándula tiroides. Se trata de la manifestación más obvia y la descrita con mayor frecuencia. Predomina más en mujeres sobre todo en la pubertad y durante el embarazo.

La principal causa de esta patología es la falta de yodo dietético, lo que provoca que cada vez sea más difícil para la tiroides producir suficiente tiroxina, de tal manera que la glándula aumenta de tamaño para tratar de compensar y producir más tiroxina ⁷. Una causa menos importante es el consumo de varios alimentos denominados bociogénicos, o que contienen bociógenos. Los bociógenos son "antinutrientes", que afectan en forma adversa la absorción y utilización adecuada de yodo, o tienen actividad antitiroidea. Los alimentos del género *Brassica*, como repollo, col rizada y colza, y semillas de mostaza contienen bociógenos ^{4,10}.

El crecimiento de la tiroides suele ser lento, por lo que es de especial importancia el diagnóstico clínico. Cuando se alcanza un cierto tamaño, la persona puede sufrir una compresión en la tráquea, esófago o nervio recurrente, lo que conlleva una dificultad respiratoria y sensación de ahogo ⁷.

Hipotiroidismo

Es un síndrome producido cuando la tiroides no funciona correctamente y la síntesis de hormonas no es suficiente. Normalmente, la concentración sérica de T₄ está disminuida y la de TSH está por encima de los valores normales. Es la enfermedad más frecuente de la tiroides, afectando al 3- 5 % de la población ⁷.

Entre las causas más comunes, a parte de la carencia crónica de yodo en la dieta, están: la enfermedad de Hashimoto, la extirpación total o parcial de la tiroides, el tratamiento con yodo radiactivo y el padecimiento de tiroiditis ⁷.

Los síntomas del hipotiroidismo tienden a presentarse lentamente, y destaca el descenso de la tasa metabólica basal. Los síntomas iniciales incluyen: heces duras o estreñimiento, aumento de la sensibilidad al frío, fatiga, palidez, piel reseca, cara hinchada, voz ronca, agrandamiento visible de la glándula tiroides ⁴...etc.

Hipotiroidismo congénito o cretinismo endémico.

Es una enfermedad en la que hay una disminución de la producción de hormonas tiroideas en los recién nacidos por una deficiencia de yodo en la madre o alguna anomalía durante la embriogénesis.

El cretinismo se manifiesta de dos maneras: neurológica e hipotiroidea. Las características de la forma neurológica incluyen: déficit mental, apariencia característica (piel gruesa, características burdas, nariz aplastada, lengua larga...), incapacidad para caminar, etc. Mientras que la forma hipotiroidea tiene como características: pulso lento en el niño y crecimiento, edad ósea y desarrollo mental muy retardados ⁷. Es imprescindible el diagnóstico y tratamiento precoz ⁴.

2.5. Ingestas recomendadas

La ingesta de yodo recomendada por la OMS ^{5,8} para una persona mayor de 14 años es de 150 µg/día de yodo, mientras que los niños tienen unas necesidades menores, de unos 90 µg/día de yodo. Por otro lado, los niños lactantes de hasta 12 meses requieren unas cantidades superiores, unos 120 µg/día de yodo.

Aunque las recomendaciones se aplican igualmente a ambos sexos, las necesidades de yodo aumentan considerablemente durante el embarazo y la lactancia por los cambios metabólicos que se producen durante este periodo ⁵. Durante la gestación, aumenta la producción de hormona tiroidea o tiroxina, ya que la transferencia de tiroxina y yodo al feto resulta fundamental para el correcto funcionamiento de su cerebro y su función tiroidea, por lo que se necesitan mayores requerimientos. Una mujer embarazada necesita una ingestión de yodo de 220 µg/día. Aunque la producción de hormona tiroidea regresa a valores normales durante la lactancia, las necesidades de yodo continúan siendo elevadas, dado que la madre proporciona al lactante su única fuente de yodo mientras este se alimenta sólo de leche materna. Una mujer en el periodo de lactancia requiere una ingestión de yodo de 290 µg/día. Por ello, se recomienda que todas las mujeres utilicen un complejo multivitamínico que contenga al menos 150 µg/día durante la preconcepción, el embarazo y la lactancia ⁵.

3. Objetivos

Teniendo en cuenta la importancia de determinar el estado nutricional en yodo de la población, ya que se trata de un micronutriente indispensable para el desarrollo normal del organismo y cuya falta provoca deficiencias graves que pueden provocar alteraciones de por vida, el objetivo del trabajo fue conocer los distintos métodos analíticos que existen para determinar el estatus de este nutriente en la población, además de la muestra biológica más adecuada para llevar a cabo la determinación.

4. Metodología

El trabajo consistió en una revisión bibliográfica. Para ello, se realizó una búsqueda de la información relativa al trabajo en bases de datos Pubmed y Science Direct, además de todo el catálogo existente en la Universidad Complutense de Madrid.

Los límites de búsqueda establecidos fueron: el tipo de artículo científico, se han elegido los reviews y ensayos clínicos; la fecha de las publicaciones, se ha establecido el límite en 10 años; y la especie de la que trate el artículo, eligiendo el criterio: humanos. De esta manera, las palabras clave empleadas en la búsqueda han sido: *iodine deficiency*, para la cual salen 319 resultados; *status nutritional for iodine*, para la cual salen 97 artículos y *iodine urine analytical methods*, para la cual salen 47 artículos. Finalmente, se han usado 20 artículos de estos para la realización de la revisión bibliográfica.

5. Resultados y discusión

5.1. Métodos para evaluar el estado nutricional en yodo en la población.

El estado nutricional del yodo no puede evaluarse en individuos aislados debido a la variación de las concentraciones de yodo a lo largo del día, pero si puede utilizarse para evaluar el estado nutricional del yodo a nivel de la población. El motivo por el que estas variaciones no influyen a nivel poblacional es que estas fluctuaciones tienden a equilibrarse entre los grupos de población, lo que proporciona una medición útil.

En poblaciones en zonas con riesgo de carencias de yodo, generalmente se recomiendan cuatro métodos para evaluar el estado nutricional de yodo: las concentraciones medias de yodo en orina, la tasa de bocio y las concentraciones séricas de TSH y tiroglobulina sérica. Las concentraciones medias de yodo en orina son indicadores de la ingesta reciente de yodo, las concentraciones séricas de TSH y tiroglobulina revelan respuestas intermedias (semanas a meses) y la tasa de bocio refleja la nutrición a largo plazo del yodo ⁵.

El método más utilizado para evaluar el estado nutricional de la población es la determinación de las concentraciones medias de yodo en orina, dado que es el más barato y rentable, y que la mayor parte del yodo se excreta por vías urinaria ¹¹.

Con respecto a la determinación de la tasa de bocio en la población, la OMS ⁴ categoriza el bocio en diferentes niveles según sea la tiroides palpable y visible. El inconveniente de este método es que durante el tratamiento, la tasa de bocio es difícil de interpretar porque puede incidir la historia del estado nutricional del yodo, así como el estado nutricional actual. Por ello, es necesario destacar que

además de la facilidad y utilidad de la determinación de la yoduria, gracias a esta también se puede diagnosticar el bocio sin necesidad de ningún examen clínico. En los últimos años, los médicos recomiendan el uso de ultrasonografía para producir una imagen de la tiroides, método bastante aceptado debido a que no es invasivo y no implica exposición a rayos-X.

Finalmente se cuenta con la determinación de las concentraciones séricas de las hormonas tiroideas, que generalmente se usan como indicadores deficientes del estado nutricional del yodo. En las poblaciones deficientes, las concentraciones séricas de T_3 y TSH aumentan o permanecen sin cambios mientras que T_4 generalmente, disminuye ⁵. Este aumento de la concentración de T_3 es una respuesta adaptativa de la tiroides a la deficiencia. Sin embargo, la concentración de la hormona tiroidea en sangre se puede convertir en un parámetro insensible respecto a ingesta de yodo, ya que en algunos casos estos rangos pueden considerarse normales. Las determinaciones de T_4 y TSH han sido sustituidas en los últimos años por las técnicas de radioinmunoensayo (RIE) ⁵.

5.2. Determinación de la yoduria en la población.

Cuando el organismo funciona correctamente existe un equilibrio entre la ingesta de yodo y la cantidad de este que se elimina por la orina ⁹. Por tanto, teniendo en cuenta que la biodisponibilidad del yodo es alta, casi el 90% del yodo consumido es excretado en la orina, y que las muestras de orina son fáciles de recoger, la yoduria se convierte en el principal indicador del estado de yodo.

La yoduria fluctúa con la concentración de yodo en sangre, lo cual depende básicamente de la ingesta de yodo y de la cantidad absorbida en el intestino. También hay que tener en cuenta que la yoduria no es totalmente independiente de la función tiroidea, y aquellas personas con hipotiroidismo subclínico eliminan más yodo por la orina, ya que su tiroides es capaz de captar una menor cantidad de yodo.

Salvo casos excepcionales, la medición del cociente yodo/creatinina, expresado como microgramo de yodo por gramo de creatinina ($\mu\text{g/g}$), en una muestra ocasional de orina permite evaluar la excreción urinaria de yodo en 24 h ^{9,11}. Se ha llegado al consenso de si la excreción media de yodo está por debajo de 20 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, se puede concluir que, en general, la carencia de yodo es un problema en la población.

De esta forma, se puede clasificar la ingesta de yodo como insuficiente, suficiente o superior a las necesidades, teniendo en cuenta el rango de edad y las situaciones fisiológicas (Tabla 1).

Tabla 1: Criterios epidemiológicos para evaluar la ingesta de yodo en una población basada en la concentración de yodo medida en orina

	MEDIDA DEL YODO EN ORINA		
INGESTA DE YODO	Niños (> 6 años)	Embarazadas	Madres y lactantes < 2 años
Insuficiente	<20 µg/L: carencia grande	>150 µg/L	<100 µg/L
	20- 49 µg/L: carencia moderada		
	50- 99 µg/L: leve carencia		
Suficiente	100- 199 µg/L	150- 249 µg/L	> 100 µg/L
Superior a las necesidades	200- 299 µg/L	250- 499 µg/L	
Excesiva	> 300 µg/L	>500 µg/L	

Fuente: Knust KS., Leung AM. Iodine: Nutritional aspects

5.2.1. Recogida y tratamiento de las muestras de orina

Dada la gran fluctuación de yodo en un individuo a lo largo del día, se toman muestras de un grupo de población de unas 40- 50 personas para que los resultados sean más precisos.

Aunque lo más adecuado es usar muestras de orina de 24 horas, dada la dificultad de recoger este tipo de muestra en estudios poblacionales, lo más habitual es el uso de muestras de orina puntuales (de primera hora de la mañana) ⁹.

Las muestras de orina se recogen en tubos de plástico apropiados según el volumen necesario y se tapan de inmediato para evitar contaminaciones. En general, se requieren pequeñas cantidades de orina (0,5-1,0 ml), excepto para el método de cromatografía líquida de alta resolución, para el que son necesarios unos 5 ml de orina ¹². Se recomienda guardar un duplicado de la muestra de orina para posibles repeticiones.

Para la mayoría de los métodos no es necesario adicionar ningún tipo de conservante, ni siquiera refrigerar si la determinación no se realiza rápidamente. Para períodos de almacenamiento de meses, conviene refrigerarlos para evitar malos olores. Para la determinación por cromatografía líquida de alta resolución, se recomienda refrigerar los tubos durante 24 h y congelarlos para períodos de almacenamiento más largos ¹².

Se debe evitar la evaporación, ya que ese proceso causaría incrementos en la concentración. Asimismo, las muestras pueden congelarse y descongelarse varias veces, pero es necesario que la alícuota que se vaya a procesar esté totalmente descongelada antes de realizar el análisis.

Los métodos para la determinación de yodo en orina son sencillos, pero es necesario tener especial cuidado durante su manejo para evitar la contaminación, para lo que se utilizan áreas especiales en el laboratorio, guantes, reactivos separados del resto, etc. Independientemente del método de determinación analítica de yodo que se emplee se usa una matriz compleja, por lo que hay que tener en cuenta sus interacciones con otros elementos.

5.2.2. Métodos analíticos existentes para la determinación de la yoduria

En la actualidad se dispone de numerosos métodos analíticos, la amplia disponibilidad de métodos para la determinación de yoduria permite su selección en función del grado de equipamiento de los laboratorios disponibles y de los objetivos de estudio que se planteen. De esta manera, los criterios para valorar los métodos para la determinación de yodo están basados en la practicabilidad, la rapidez, las exigencias técnicas, la complejidad de los instrumentos, los proveedores exclusivos, la seguridad y el coste.

A pesar de la gran variedad de métodos existentes para el análisis, todos ellos comparten una serie de inconvenientes: el tiempo de preparación de la muestra, que los sistemas de detección son a menudo muy caros, las dificultades que conllevan la preservación de muestras biológicas, o el uso inadecuado de los reactivos durante la digestión.

a) Métodos colorimétricos

Son los métodos analíticos más empleados para analizar la concentración de yodo total en orina y están basados en la reacción de Sandell- Kolthoff.

La reacción de Sandell- Kolthoff es una técnica simple, sensible y fiable para la determinación de yodo en materiales biológicos. Estos métodos analíticos constan de una primera *reacción de digestión*, en la que se eliminan las sustancias que interfieren en el efecto catalítico del yodo; seguido de la *reacción de Sandell- Kolthoff*, de la cual se obtiene una lectura espectrofotométrica.

Reacción de digestión.

Existen una serie de sustancias presentes en la orina denominadas interferentes, tales como el ácido L-ascórbico, tiocianato de potasio, trazas de iones de metales como plata o mercurio, y sustancias que experimentan una fácil oxidación como el nítrico, ácido ascórbico y ión ferroso ¹¹. Estas sustancias

pueden contribuir positivamente como catalizadores del yodo en la reacción de Sandell-Kolthoff, por lo que se requiere su eliminación antes del análisis.

La digestión de la muestra se puede llevar a cabo a través del *método de las cenizas secas*, por un álcali fuerte como es el persulfato amónico; o por el *método de cenizas húmedas*, por el ácido clórico.

I Método de las cenizas secas

Se trata de un método de pre- tratamiento, llevado a cabo antes del análisis, que consiste en el secado de las muestras en un horno a 100°C, seguido de una incineración del residuo seco por un álcali fuerte como puede ser: KOH/K₂CO₃ o persulfato amónico ¹³, durante un tiempo aproximado de 3 horas a altas temperaturas, unos 600 °C. En análisis posterior usarán las cenizas que resultan de la calcinación una vez que se han reconstruido con agua destilada.

Se trata de un procedimiento lento y costoso, que además requiere emplear un material de laboratorio específico, como unos tubos de paredes gruesas resistentes al calor, un horno de mufla y un microprocesador para controlar la temperatura, importante para evitar pérdidas de yodo.

El inconveniente de este método es que es especialmente sensible a la contaminación cruzada al ser incineradas juntos en el mismo horno, y se producen una gran cantidad de residuos. El área de trabajo en la que se lleva a cabo el proceso de incineración ha de ser una zona aislada, limpia y libre de reactivos que contengan yodo.

II Método de las cenizas húmedas

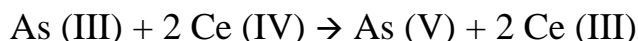
La pre- digestión de las muestras de orina se lleva a cabo con ácido clórico como agente digestivo, que es eficaz en cuanto a la eliminación de estas sustancias, pero tiene una serie de inconvenientes ¹¹. Primeramente, se trata de una sustancia de difícil elaboración, se prepara a partir de ácido perclórico y clorato potásico ¹¹; además se trata de unas sustancias muy peligrosas para la salud porque pueden resultar explosivas, por lo que se requieren ciertas precauciones de seguridad como el uso de una campana que capte todos los gases que se producen durante la digestión o sistemas de ventilación adecuados ¹³. Por la gran cantidad de inconvenientes, el persulfato amónico ha reemplazado al ácido clórico como reactivo oxidante, ya que se trata de una sustancia no explosiva y poco peligrosa.

Una vez que se han añadido las muestras de orina en tubos de ensayo resistentes al calor se les suele añadir una solución de glucosa y ácido sulfúrico para evitar la precipitación de proteínas, seguidamente se les añade una solución "de incineración" de ácido fuerte y se agita con vórtex ¹³. La ruptura de ácido perclórico hace que se oxide la muestra. A continuación, se enfría para llevarse a cabo la reacción colorimétrica de Sandell- Kolthoff.

Reacción de Sandell-Kolthoff.

Se trata de una reacción en dos etapas en la que se mide la velocidad de reacción de reducción de sulfato cérico (IV), de color amarillo, por arsenito en presencia de yoduro, para formar los iones cerosos incoloros y el yodo elemental ¹¹. La disminución del color amarillo durante un período fijo es medida por un colorímetro con un filtro apropiado o con un espectrofotómetro y una curva estándar construida con cantidades conocidas de yodo ¹⁴.

Reacción de Sandell- Kolthoff



La velocidad de dicha reacción depende de la cantidad de yoduro presente en la muestra. La cuantificación de yodo se lleva a cabo sabiendo que el tiempo en que transcurre la reacción es inversamente proporcional a la cantidad de yodo presente en la muestra.

El ión Ce (IV) en disolución ofrece una coloración amarillenta, mientras que el ión reducido Ce (III) disuelto origina disoluciones incoloras. De esta forma, se registra el descenso de la coloración de la disolución de Ce (IV) en presencia de yoduro, que es el catalizador. A mayor concentración de yoduro presente, más brusco será el descenso en la absorbancia monitorizada. Se establece así una relación lineal entre la pendiente negativa de la línea que representa la disminución con respecto del valor de la absorbancia registrado, y la concentración de yoduro presente ¹⁴.

La determinación espectrofotométrica se lleva a cabo con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405- 420 nm, aunque la sensibilidad máxima se puede alcanzar a 310- 317 nm ¹⁴.

Las concentraciones de yodo se determinan calculando, primeramente, el valor medio de absorbancia para cada conjunto de patrones de referencia y cada conjunto de muestras. Luego, se hace una curva estándar, que se construye representando la absorbancia media (eje Y, lineal) obtenida para cada estándar de referencia contra sus concentraciones en nmol/L (eje X, log), y se hace una interpolación de puntos ¹¹.

Algunas modificaciones de este método que se han desarrollado con el fin de simplificar el procedimiento, optimizarlo y reducir sus costes, son la utilización tanto de microplacas o métodos semicuantitativos. El *método de las microplacas* es una modificación tanto de la digestión como de la reacción de Sandell- Kolthoff, ya que ambos procesos se incorporan a un formato de microplaca; mientras que los *métodos semicuantitativos* son una modificación de la reacción de Sandell- Kolthoff.

Métodos de las microplacas.

Es un método sencillo y rápido en el que se llevan a cabo tanto la digestión como la reacción colorimétrica en un formato de microplaca. Sin embargo, las ventajas del método afectan mayoritariamente a la fase de digestión con ácido clórico.

La diferencia con respecto al método de las cenizas húmedas convencional es que el procedimiento de digestión se lleva a cabo en unas placas de microtitulación colocadas en un cassette de acero inoxidable especial herméticamente cerrado, por lo que se evita la salida de los vapores resultantes de la digestión con ácido clórico. Por tanto, es un método mucho menos peligroso. Sin embargo, si que existe un cierto riesgo de condensación de estos vapores durante el enfriamiento de los cassettes con agua del grifo a temperatura ambiente. Después se produce la reacción Sandell- Kolthoff en la microplaca, y finalmente, se mide el yodo urinario en un lector de microplacas a 405 nm ¹⁵.

Este método puede ser ligeramente modificado para adaptarse a la infraestructura del laboratorio, utilizando un bloque de calefacción en lugar del cassette. Se reduce una gran cantidad de residuos con respecto al método de digestión por persulfato amónico.

Métodos semicuantitativos.

Se trata de una modificación de la convencional reacción de Sandell- Kolthoff, que se emplea en situaciones en las que es necesario un rápido y simple análisis del yodo. Se requiere una instrumentación menos sofisticada, el método "Fast B" ¹². El método Fast B utiliza el indicador redox ferroina/ ácido arsenioso y un cronómetro, en lugar de un espectrofotómetro, para medir el tiempo que tardan en producirse los cambios de color, y por tanto, el contenido de yodo.

b) Electrodos selectivos de iones

Este método consiste en la utilización de electrodos selectivos de iones para medir la concentración de yoduro en la muestra de orina. Es un método muy simple que consta tan sólo de un recipiente donde colocar la muestra, y al que se incorpora el electrodo selectivo de yodo.

Los electrodos poseen una membrana sensible selectiva a este ión, de tal forma que cuando se sumerge el electrodo selectivo en la muestra, en su membrana se desarrolla un potencial debido a una reacción selectiva y espontánea. Para medir este potencial, además del electrodo selectivo indicador, es necesario un electrodo de referencia, cuya función es proporcionar un potencial constante frente al que poder medir las variaciones debidas al electrodo indicador. Para completar el circuito electroquímico, ambos electrodos se conectan a un voltímetro muy sensible, que mida la diferencia de potencial.

La concentración de yoduro se calcula midiendo la diferencia de potencial causada por el contacto del electrodo con el yoduro, respecto de la diferencia de potencial en el electrodo de referencia. A mayor

diferencia de potencial generado, mayor es la concentración de yoduro en la solución. Existe una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de yoduro y la fuerza electromotriz (FEM) generada.

Es importante el control de la temperatura, ya que se trata de un parámetro que afecta considerablemente las medidas del potencial. La temperatura ha de permanecer constante durante el análisis con el electrodo selectivo, tanto durante la calibración con patrones como durante la medida de las muestras.

Por otro lado, el potencial de un electrodo selectivo responde a la actividad de los iones, no a su concentración. Por tanto, para que la actividad del ión y su concentración se asemejen, se añade tanto a los patrones como a las muestras un ajustador de fuerza iónica. Se trata de una disolución de fuerza iónica elevada que no interfiera con la muestra y que iguale la fuerza iónica de patrones y muestras.

Se trata de un método rápido y sencillo ^{16, 17}. No se requieren de equipos especializados para el análisis, por lo que podría hacerlo cualquier laboratorio independientemente de su nivel adquisitivo. Los inconvenientes que presenta este método es que los electrodos se recubren con un material específico, que requiere de limpieza frecuentemente para que no haya interferencias, además de que no es un método recomendado para la usarse en orina por la gran cantidad de sustancias interferentes que tiene, como sulfitos. Se emplea más para determinar específicamente yodo en presencia de otros compuestos yodados, ya que los electrodos sólo responden al yodo.

c) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica.

Se trata de una cromatografía de fase inversa o reversa, en la que se produce la retención del compuesto por diferencia de polaridad. Consiste en la inyección de la muestra junto con la fase móvil a una columna cromatográfica, de tal manera que sólo los compuestos no polares quedan retenidos por la fase estacionaria. Finalmente, se detecta la concentración de yoduro por detección electroquímica.

La fase estacionaria es una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Los soportes para casi todos los rellenos se preparan con sílica, formada por partículas resistentes, porosas y uniformes. La fase móvil suele ser agua y otra molécula hidrófila, como Na_2HPO_4 o di- n- butilamina, a un pH de 7 para que no haya reacciones no deseadas. Como ajustador de pH se puede utilizar el ácido ortofosfórico ¹⁸.

Muchos compuestos iónicos y altamente polares no se pueden separar eficazmente con fase reversa sin el uso de reactivos que formen “par iónico” con la muestra. Se añade a la fase móvil, de forma que la parte aniónica de estos reactivos se asocian con la carga positiva anulándola y aumentando su

hidrofobicidad. Así, pueden ser también adsorbidos por la fase estacionaria y por tanto, quedar retenidos para su posterior análisis.

El detector es un dispositivo electroquímico que mide la diferencia de potencial entre una solución de concentración conocida y la muestra. Normalmente, el electrodo es de metal noble como la plata, platino u oro, y de carbón. No obstante, de todos ellos, los que mejores resultados han dado son los de Pt, ya que no reaccionan con los altos niveles de cloruro presentes en los fluidos biológicos. En los últimos años, se han desarrollado unos nanodiscos de oro ¹⁸, que suponen una ventaja ya que no necesitan la etapa de pre- tratamiento.

Algunos de los diferentes métodos electroquímicos que existen son: amperometría, voltametría, impedancia, etc. Los más empleados son aquellos que se basan en la amperimetría ¹⁹. La detección amperométrica mide la corriente generada cuando el yoduro es oxidado o reducido en el interior de la columna cromatográfica por el intercambiador de iones de la fase estacionaria. La oxidación o reducción de los iones depende de la aplicación de un potencial entre el electrodo de trabajo y el auxiliar. Para la determinación de yoduro se emplea una diferencia de potencial de 0,10 V respecto al electrodo de referencia, por lo que se mide la oxidación que sufre el yoduro ¹⁹. El método de retención de los iones yoduro es el intercambio aniónico, es decir, la atracción electrostática entre los iones yoduro vehiculizados por la fase móvil, con los grupos funcionales que lleve la fase estacionaria, normalmente, grupos amonio cuaternarios. La señal medida consiste en la intensidad de la corriente generada entre ambos electrodos.

Una vez que se ha llevado a cabo el proceso de detección, se prepara una curva de calibrado partiendo de una solución madre de KI, a partir de la cual se preparan soluciones de los estándares. El cálculo de la concentración de iones yoduro de las muestras se realiza comparando con la curva de calibración, representando en el eje de abscisas a concentración de los estándares de yoduro y en el eje de ordenadas, la respuesta del detector en voltios ¹².

Las ventajas que presenta la detección electroquímica son que las pequeñas cantidades de muestra necesaria para el análisis (unos 0,1 mL), las pequeñas cantidades de reactivos requeridos para el uso de tales procedimientos y una velocidad rápida, que hacen que se reduzcan los costes de análisis. Otras de sus ventajas son: alta precisión, buena sensibilidad, facilidad de preparación de fase móvil, buena reproducibilidad, posibilidad de miniaturización y un límite suficiente de cuantificación ¹⁸. Es de fácil realización y para su puesta en marcha sólo es necesario un equipo de cromatografía líquida convencional, disponible en muchos laboratorios.

d) Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP- Masas)

Se trata de una técnica en la que la muestra se ioniza por efecto de un plasma de argón, y estos iones son separados en función de su relación masa/ carga en un espectrofotómetro de masas y cuantificados por un detector multiplicador de electrones. Por tanto, se trata de dos técnicas acopladas inductivamente, de tal manera que una de ellas se encarga de ionizar la muestra, y la otra de separar los iones formados.

El sistema de inyección de la muestra líquida es un sistema nebulizador, el cual crea un aerosol con gotitas de tamaño pequeño y uniforme, a altas temperaturas, en una cámara de pulverización. Se consigue así la atomización, por efecto Venturi, de la muestra que entra en el dispositivo convirtiéndose en átomos gaseosos que luego se ionizan, pasando al estado de plasma. La generación del plasma se consigue sometiendo un flujo de gas, que se conoce como gas plasmógeno (Ar usualmente), a la acción de un campo magnético oscilante, inducido por una corriente que oscila a alta frecuencia. La radiofrecuencia origina colisiones no elásticas entre Ar^+ y electrones, de forma que por el efecto Joule se alcanzan temperaturas de hasta 10.000K ²¹.

Los iones yoduro generados pasan al espectrofotómetro de masas a través de una interfase de acondicionamiento. En esta interfase tanto el plasma como los iones pasan desde condiciones atmosféricas a alto vacío en el espectrómetro de masas. Los espectrómetros de masas trabajan a baja presión (alto vacío). El vacío en la interfase se consigue mediante una bomba rotatoria. La interfase comprende una etapa de bajo vacío, por donde pasa una porción de iones del plasma y es transferida a regiones de alto vacío, donde se encuentran las lentes de enfoque.

Las lentes iónicas tienen como función la de enfocar y dirigir el haz de iones hacia el analizador, normalmente de tipo cuadrupolo, donde son separados según su masa/ carga por un analizador y analizados por un detector de electrones. Junto con las lentes también existe una barrera de fotones que impide que la luz emitida en los procesos de generación del plasma pasen a través del analizador de masas y llegue al detector.

Se trata de un método bastante preciso y con un alto rendimiento ²¹. Las ventajas de este método con respecto a la Sandell- Kolthoff son que se reduce el consumo de productos químicos, reduce los costes y produce residuos menos tóxicos. Además, la orina contiene sustancias que si no se oxidan por la reacción de digestión adecuada, pueden interferir con la Sandell- Kolthoff. Sin embargo, en la ICP-MS no es necesario la digestión previa ni la oxidación, lo cual supone una gran ventaja ²².

Uno de los problemas que supone este método es que la combinación de un nebulizador y la cámara de pulverización en ICP- MS podría causar la evaporación selectiva de especies de yodo volátiles, por lo que se perdería yodo a analizar y por tanto, disminuiría la eficacia de método. La manera de

solucionar este problema es usando una cámara de pulverización ciclónico de tamaño reducido, que hace que haya menos interacciones.

Este método es el más utilizado, el "gold standard", por su grado de precisión, su versatilidad, poco tiempo requerido y por su capacidad de analizar grandes cantidades de muestras. Por ello, se considera actualmente como el método de referencia ²¹. Sin embargo, también hay que tener en cuenta el gran coste que supone disponer de este equipo y costearse el análisis, y aunque el coste es compensado por los beneficios, no todos los laboratorios se lo pueden permitir.

5.2.3. Comparación de los métodos analíticos estudiados

Tabla 2: Tabla comparativa de los métodos analíticos estudiados

	Valoración colorimétrica (Reacción Sandell- Kolthoff)		Electrodos selectivos de iones ¹⁷	HPLC (con detección electroquímica) ²¹	ICP- MS ¹⁶
	Cenizas húmedas ¹⁶	Cenizas secas ¹³			
Tiempo del análisis	30 min	3 horas	5 min	7,5 min	25 min
Sensibilidad	10- 40 µg/L	10- 40 µg/L	6 µg/L	11- 26 µg/L	3 µg/L
Límite de detección	3,9 µg/L	3,4 µg/L	1,96 µg/L	4 µg/L	4 µg/L
Precisión interensayo (CV %)	< 10 %	7,9- 10,2 %	10,5-18%	10 %	13%
Precisión intraensayo (CV %)	< 3%	4- 9,1 %	5,7-10,5%	3,9 %	3%
Recuperación	92- 104%	94- 107 %	91-112%	95, 3- 98,8 %	94- 103 %
Temperatura de trabajo	100° C	600 °C	Cualquiera, pero ha de ser cte	35° C	Muy alta (unos 10.000 °C)
Necesidad de eliminación de sustancias interferentes	Si	Si	Se necesita añadir una solución bacteriostática	Si	No
Peligrosidad	Si	No	No	No	No
Coste del equipo	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Alto

Teniendo en cuenta lo anterior, se observa que los dos métodos más empleados son los colorimétricos, basados en la reacción de Sandell- Kolthoff y la ICP-MS. Comparando los dos, vemos como la mejor

opción es la ICP- MS por su alta precisión, sus bajos límites de detección y por su capacidad de analizar grandes cantidades de muestra.

6. Conclusión

La cuantificación de yodo en la orina es un buen indicador del estado nutricional en yodo, sin embargo, presenta una serie de inconvenientes como que no da información directa sobre la función tiroidea, y que no se puede emplear a nivel individual dadas las grandes fluctuaciones de concentración de la hormona a lo largo del día, por lo que se emplea la evaluación de los niveles de yodo en la orina a nivel poblacional.

El método más eficaz para medir la concentración de yodo en orina es método por ICP- MS por su grado de precisión, su versatilidad y rapidez del análisis. Se considera el "gold standart", sin embargo, tiene el inconveniente de el equipo es bastante costoso y a pesar de que el coste es compensado por los beneficios de procesar un gran número de muestras con alta precisión y bajos límites de detección se trata de un equipo que emplean tan solo los grandes laboratorios.

No obstante, la elección del método para analizar el estatus nutricional de yodo en la población depende de las necesidades y de los recursos disponibles.

7. Bibliografía

1. Contanzo LS. Fisiología endocrina. Fisiología, 5º ed, Barcelona: Elsevier España, 2011. p. 494.
2. Silverthorn. Control endocrino del crecimiento y el metabolismo. Fisiología Humana, un enfoque integrado, 6º ed, Panamericana, 2014. p. 976.
3. Guyton y Hall. Endocrinología y reproducción: Hormonas metabólicas tiroideas. Tratado de fisiología médica, 13º ed. Elsevier, 2016. p. 1168.
4. Requejo AM., Ortega RM. Nutriguía: Manual de nutrición clínica en atención primaria. Ed, Complutense, 2009. p. 672.
5. Knust KS., Leung AM. Iodine: Nutritional aspects. Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals, 2017
6. Zimmermann, M.B. Iodine Deficiency. Endocrine Review, 2009, 30 (4): 376- 408
7. Ortega, Requejo. Nutriguía: Manual de nutrición clínica, 2º ed, Panamericana, 2015. p. 600.
8. Anderson, M., de Benoist, B., Darton-Hill, I., Delange, F. (Eds.). Iodine Deficiency in Europe. World Health Organization, UNICEF, 2007

9. Millón MC., Soriguer F., Muñoz R., Mancha I., Gómez-Huelga R., Goiburu E., García Almeida JM., González-Romero S., Rojo-Martínez G. Los determinantes de la yoduria en una población escolar del sur de España. *Endocrinología y Nutrición*. Vol. 48, Num. 4, 2001
10. Repetto M., Repetto G. Fenómenos de inhibición, activación e inducción enzimática. *Toxicología fundamental*. 4º ed, Díaz Santos, 2009. p. 565.
11. Haap M., Roth HJ., Huber T., Dittmann H., Wahl R. Urinary iodine: Comparison of a simple method for its determination in microplates with measurement by inductively- coupled plasma mass spectrometry. *Sci Rep*. 2017
12. Espada Saenz- Torre M. La medición de yodo en la orina: revisión de las técnicas. *Endocrinol Nutr*. 2008; Supl 554.
13. Pino S., Fang SH, Braverman LE. Ammonium persulfate: A safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106 Suppl 3, 1998, S22–27
14. Shelor CP., Dasgupta PK. Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Anal Chim Acta*. 702(1), 2011, 16-36
15. Ohashi T, Yamaki M, Pandav CS, Karmarkar MG, Irie M. Simple microplate for determination of urinary iodine. *Clin Chem*. 46(4), 2000, 529-36.
16. Yabu Y., Miyai K., Hayashizaki S., Endo Y., Hata N., Iijima Y., Fushimi R. Measurement of iodine in urine using the iodine selective ion electrode. *Endocrinol, Japon*, 33 (6), 1986, 905- 911
17. Abraham GE., Flechas JD., Hakala JC. Measurement of Urinary Iodide Levels by Ion-Selective Electrode: Improved Sensitivity and Specificity by Chromatography on Anion-Exchange Resin. *The original internist*, 2004, 19-32
18. Rendl J., Seybold S., Börner. Urinary iodide determined by paired- ion reversed- phased HPLC with electrochemical detection. *Clin chem* 40(8), 1994, 906- 913
19. Blazewicz A., Klatka M., Dolliver W., Kocjan R. Determination of total iodine in serum and urine by ion chromatography with pulsed amperometric detection- Studies on analyte loss, optimization of sample preparation procedures, and validation of analytical method. *Journal of Chromatography B*, 2014, 41- 146
20. Macours P., Aubry JC., Hauquier B., Boeynaems JM., Goldman S., Moreno- Reyes R. Determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of trace elements in medicine and biology* Vol 22, 2008, 162- 165
21. Bernhard M., Witte H. Characterization of a rapid and reliable method for iodine biomonitoring in serum and urine based on ion chromatography- ICP- mass spectrometry. B Michalke et al. *J Trace Elem Med Biol* 29, 2014, 63-68.